



## IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

IN RE APPLICATION OF: Mike FARWICK, et al.

GAU:

SERIAL NO: 09/950,071

EXAMINER:

FILED: September 12, 2001

FOR: NUCLEOTIDE SEQUENCES WHICH CODE FOR THE RODA PROTEIN

## REQUEST FOR PRIORITY

ASSISTANT COMMISSIONER FOR PATENTS  
WASHINGTON, D.C. 20231

SIR:

Full benefit of the filing date of U.S. Application Serial Number [US App No], filed [US App Dt], is claimed pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §120.

Full benefit of the filing date of U.S. Provisional Application Serial Number , filed , is claimed pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §119(e).

Applicants claim any right to priority from any earlier filed applications to which they may be entitled pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §119, as noted below.

In the matter of the above-identified application for patent, notice is hereby given that the applicants claim as priority:

COUNTRY	APPLICATION NUMBER	MONTH/DAY/YEAR
GERMANY	100 44 943.3	September 12, 2000
GERMANY	101 32 947.4	July 6, 2001

Certified copies of the corresponding Convention Application(s)

are submitted herewith

will be submitted prior to payment of the Final Fee

were filed in prior application Serial No. filed

were submitted to the International Bureau in PCT Application Number .  
Receipt of the certified copies by the International Bureau in a timely manner under PCT Rule 17.1(a) has been acknowledged as evidenced by the attached PCT/IB/304.

(A) Application Serial No.(s) were filed in prior application Serial No. filed ; and

(B) Application Serial No.(s)

are submitted herewith

will be submitted prior to payment of the Final Fee

Respectfully Submitted,

OBLOON, SPIVAK, McCLELLAND,  
MAIER & NEUSTADT, P.C.
  
 Norman F. Oblon  
 Registration No. 24,618

 Daniel J. Pereira, Ph.D.  
 Registration No. 45,518


22850

Tel. (703) 413-3000  
Fax. (703) 413-2220  
(OSMMN 10/98)

## BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung  
einer Patentanmeldung**

**Aktenzeichen:** 100 44 943.3  
**Anmeldestag:** 12. September 2000  
**Anmelder/Inhaber:** Degussa AG, Düsseldorf/DE  
Erstanmelder: Degussa-Hüls Aktiengesellschaft,  
Frankfurt am Main/DE  
**Bezeichnung:** Neue für das rodA-Gen kodierende  
Nukleotidsequenzen  
**IPC:** C 12 N, C 12 Q, C 07 H

**Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.**

München, den 02. August 2001  
**Deutsches Patent- und Markenamt**  
**Der Präsident**  
 Im Auftrag

Jerofsky

**Neue für das rodA-Gen kodierende Nukleotidsequenzen**

Gegenstand der Erfindung sind für das rodA-Gen kodierende Nukleotidsequenzen aus coryneformen Bakterien und ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren

5 unter Verwendung von Bakterien, in denen das rodA-Gen verstärkt wird.

**Stand der Technik**

L-Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, finden in der Humanmedizin und in der pharmazeutischen Industrie, in der

10 Lebensmittelindustrie und ganz besonders in der Tierernährung, Anwendung.

Es ist bekannt, daß Aminosäuren durch Fermentation von Stämmen coryneformer Bakterien, insbesondere Corynebacterium glutamicum, hergestellt werden. Wegen der

15 großen Bedeutung wird ständig an der Verbesserung der Herstellverfahren gearbeitet. Verfahrensverbesserungen können fermentationstechnische Maßnahmen wie zum Beispiel Rührung und Versorgung mit Sauerstoff, oder die Zusammensetzung der Nährmedien wie zum Beispiel die

20 Zuckerkonzentration während der Fermentation, oder die Aufarbeitung zur Produktform durch zum Beispiel Ionenaustauschchromatographie oder die intrinsischen Leistungseigenschaften des Mikroorganismus selbst betreffen.

25 Zur Verbesserung der Leistungseigenschaften dieser Mikroorganismen werden Methoden der Mutagenese, Selektion und Mutantenauswahl angewendet. Auf diese Weise erhält man Stämme, die resistent gegen Antimetabolite oder auxotroph für regulatorisch bedeutsame Metabolite sind und

30 Aminosäuren produzieren.

Seit einigen Jahren werden ebenfalls Methoden der rekombinanten DNA-Technik zur Stammverbesserung von

L-Aminosäure produzierenden Stämmen von *Corynebacterium* eingesetzt, indem man einzelne Aminosäure-Biosynthesegene amplifiziert und die Auswirkung auf die Aminosäure-Produktion untersucht.

## 5 Aufgabe der Erfindung

Die Erfinder haben sich zur Aufgabe gestellt, neue Maßnahmen zur verbesserten fermentativen Herstellung von Aminosäuren bereitzustellen.

### Beschreibung der Erfindung

- 10 Werden im folgenden L-Aminosäuren oder Aminosäuren erwähnt, sind damit eine oder mehrere Aminosäuren einschließlich ihrer Salze, ausgewählt aus der Gruppe L-Asparagin, L-Threonin, L-Serin, L-Glutamat, L-Glycin, L-Alanin, L-Cystein, L-Valin, L-Methionin, L-Isoleucin, L-Leucin, L-Tyrosin, L-Phenylalanin, L-Histidin, L-Lysin, L-Tryptophan und L-Arginin gemeint. Besonders bevorzugt ist L-Lysin.
- 15

Wenn im folgenden L-Lysin oder Lysin erwähnt werden, sind damit nicht nur die Basen, sondern auch die Salze wie z.B. Lysin-Monohydrochlorid oder Lysin-Sulfat gemeint.

- 20 Gegenstand der Erfindung ist ein isoliertes Polynukleotid aus coryneformen Bakterien, enthaltend eine für das rodA-Gen kodierende Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe
  - a) Polynukleotid, das mindestens zu 70% identisch ist mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2 enthält,
  - b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70% identisch ist mit der Aminosäuresequenz von
- 25
- 30 SEQ ID No. 2,

c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den Polynukleotiden von a) oder b), und

d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15 aufeinanderfolgende Nukleotide der Polynukleotidsequenz von a), b) oder c),

wobei das Polypeptid bevorzugt die Aktivität des Zellteilungsproteins RodA aufweist.

Gegenstand der Erfindung ist ebenfalls das oben genannte Polynukleotid, wobei es sich bevorzugt um eine replizierbare DNA handelt, enthaltend:

(i) die Nukleotidsequenz, gezeigt in SEQ ID No. 1, oder

(ii) mindestens eine Sequenz, die der Sequenz (i) innerhalb des Bereichs der Degeneration des genetischen Kodes entspricht, oder

(iii) mindestens eine Sequenz, die mit der zur Sequenz (i) oder (ii) komplementären Sequenz hybridisiert, und gegebenenfalls

(iv) funktionsneutralen Sinnmutationen in (i).

Weitere Gegenstände sind

ein replizierbares Polynukleotid, insbesondere DNA, enthaltend die Nukleotidsequenz wie in SEQ ID No. 1 dargestellt;

ein Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz, wie in SEQ ID No. 2 dargestellt, enthält;

ein Vektor, enthaltend das erfindungsgemäße Polynukleotid, insbesondere Pendelvектор oder Plasmidvектор, und

coryneforme Bakterien, die den Vektor enthalten oder in denen das rodA-Gen verstkt ist.

Gegenstand der Erfindung sind ebenso Polynukleotide, die im wesentlichen aus einer Polynukleotidsequenz bestehen, die 5 erhältlich sind durch Screening mittels Hybridisierung einer entsprechenden Genbank eines coryneformen Bakteriums, die das vollständige Gen oder Teile davon enthält, mit einer Sonde, die die Sequenz des erfindungsgemen Polynukleotids gemäss SEQ ID No.1 oder ein Fragment davon 10 enthält und Isolierung der genannten Polynukleotidsequenz.

Polynukleotide, die die Sequenzen gemäss der Erfindung enthalten, sind als Hybridisierungs-Sonden für RNA, cDNA und DNA geeignet, um Nukleinsäuren beziehungsweise Polynukleotide oder Gene in voller Länge zu isolieren, die 15 für das Zellteilungsprotein RodA kodieren, oder um solche Nukleinsäuren beziehungsweise Polynukleotide oder Gene zu isolieren, die eine hohe Ähnlichkeit der Sequenz mit der des rodA-Gens aufweisen.

Polynukleotide, die die Sequenzen gemäss der Erfindung 20 enthalten, sind weiterhin als Primer geeignet, mit deren Hilfe mit der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) DNA von Genen hergestellt werden kann, die für das Zellteilungsprotein RodA kodieren.

Solche als Sonden oder Primer dienende Oligonukleotide, 25 enthalten mindestens 30, bevorzugt mindestens 20, ganz besonders bevorzugt mindestens 15 aufeinanderfolgende Nukleotide. Geeignet sind ebenfalls Oligonukleotide mit einer Länge von mindestens 40 oder 50 Nukleotiden.

„Isoliert“ bedeutet aus seinem natürlichen Umfeld 30 herausgetrennt.

„Polynukleotid“ bezieht sich im allgemeinen auf Polyribonukleotide und Polydeoxyribonukleotide, wobei es

sich um nicht modifizierte RNA oder DNA oder modifizierte RNA oder DNA handeln kann.

Die Polynukleotide gemäß Erfindung schließen ein Polynukleotid gemäß SEQ ID No. 1 oder ein daraus

5 hergestelltes Fragment und auch solche ein, die zu wenigstens 70%, bevorzugt zu wenigstens 80% und besonders zu wenigstens 90% bis 95% identisch sind mit dem Polynukleotid gemäß SEQ ID No. 1 oder eines daraus hergestellten Fragments.

10 Unter „Polypeptiden“ versteht man Peptide oder Proteine, die zwei oder mehr über Peptidbindungen verbundene Aminosäuren enthalten.

Die Polypeptide gemäß Erfindung schließen ein Polypeptid gemäß SEQ ID No. 2, insbesondere solche mit der

15 biologischen Aktivität des Zellteilungsproteins RodA und auch solche ein, die zu wenigstens 70%, bevorzugt zu wenigstens 80% und besonders zu wenigstens 90% bis 95% identisch sind mit dem Polypeptid gemäß SEQ ID No. 2 und die genannte Aktivität aufweisen.

20 Die Erfindung betrifft weiterhin ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren, ausgewählt aus der Gruppe L-Asparagin, L-Threonin, L-Serin, L-Glutamat, L-Glycin, L-Alanin, L-Cystein, L-Valin, L-Methionin, L-Isoleucin, L-Leucin, L-Tyrosin, L-

25 Phenylalanin, L-Histidin, L-Lysin, L-Tryptophan und L-Arginin, unter Verwendung von coryneformen Bakterien, die insbesondere bereits Aminosäuren produzieren und in denen die für das rodA-Gen kodierenden Nukleotidsequenzen verstärkt, insbesondere überexprimiert werden.

30 Der Begriff "Verstärkung" beschreibt in diesem Zusammenhang die Erhöhung der intrazellulären Aktivität eines oder mehrerer Enzyme in einem Mikroorganismus, die durch die entsprechende DNA kodiert werden, indem man beispielsweise

die Kopienzahl des Gens bzw. der Gene erhöht, einen starken Promotor verwendet oder ein Gen verwendet, das für ein entsprechendes Enzym mit einer hohen Aktivität kodiert und gegebenenfalls diese Maßnahmen kombiniert.

5 Die Mikroorganismen, die Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind, können L-Aminosäuren aus Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke, Cellulose oder aus Glycerin und Ethanol herstellen. Es kann sich um Vertreter coryneformer Bakterien insbesondere der

10 Gattung *Corynebacterium* handeln. Bei der Gattung *Corynebacterium* ist insbesondere die Art *Corynebacterium glutamicum* zu nennen, die in der Fachwelt für ihre Fähigkeit bekannt ist, L-Aminosäuren zu produzieren.

Geeignete Stämme der Gattung *Corynebacterium*, insbesondere  
15 der Art *Corynebacterium glutamicum* (*C. glutamicum*), sind besonders die bekannten Wildtypstämme

*Corynebacterium glutamicum* ATCC13032  
*Corynebacterium acetoglutamicum* ATCC15806  
*Corynebacterium acetoacidophilum* ATCC13870  
20 *Corynebacterium thermoaminogenes* FERM BP-1539  
*Corynebacterium melassecola* ATCC17965  
*Brevibacterium flavum* ATCC14067  
*Brevibacterium lactofermentum* ATCC13869 und  
*Brevibacterium divaricatum* ATCC14020

25 und daraus hergestellte L-Aminosäuren produzierende Mutanten bzw. Stämme.

Das neue, für das Zellteilungsprotein RodA kodierende *rodA*-Gen von *C. glutamicum* wurde isoliert.

Zur Isolierung des *rodA*-Gens oder auch anderer Gene von  
30 *C. glutamicum* wird zunächst eine Genbank dieses Mikroorganismus in *Escherichia coli* (*E. coli*) angelegt. Das Anlegen von Genbanken ist in allgemein bekannten Lehrbüchern und Handbüchern niedergeschrieben. Als Beispiel

seien das Lehrbuch von Winnacker: Gene und Klone, Eine Einführung in die Gentechnologie (Verlag Chemie, Weinheim, Deutschland, 1990), oder das Handbuch von Sambrook et al.: Molecular Cloning, A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor 5 Laboratory Press, 1989) genannt. Eine sehr bekannte Genbank ist die des *E. coli* K-12 Stammes W3110, die von Kohara et al. (Cell 50, 495-508 (1987)) in  $\lambda$ -Vektoren angelegt wurde. Bathe et al. (Molecular and General Genetics, 252:255-265, 1996) beschreiben eine Genbank von *C. glutamicum* ATCC13032, 10 die mit Hilfe des Cosmidvektors SuperCos I (Wahl et al., 1987, Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 84:2160-2164) im *E. coli* K-12 Stamm NM554 (Raleigh et al., 1988, Nucleic Acids Research 16:1563-1575) angelegt wurde.

Börmann et al. (Molecular Microbiology 6(3), 317-326) 15 wiederum beschreiben eine Genbank von *C. glutamicum* ATCC13032 unter Verwendung des Cosmids pHC79 (Hohn und Collins, Gene 11, 291-298 (1980)).

Zur Herstellung einer Genbank von *C. glutamicum* in *E. coli* können auch Plasmide wie pBR322 (Bolivar, Life Sciences, 20 25, 807-818 (1979)) oder pUC9 (Vieira et al., 1982, Gene, 19:259-268) verwendet werden. Als Wirte eignen sich besonders solche *E. coli* Stämme, die restriktions- und rekombinationsdefekt sind. Ein Beispiel hierfür ist der Stamm DH5 $\alpha$ mcr, der von Grant et al. (Proceedings of the 25 National Academy of Sciences USA, 87 (1990) 4645-4649) beschrieben wurde. Die mit Hilfe von Cosmiden klonierten langen DNA-Fragmente können anschließend wiederum in gängige, für die Sequenzierung geeignete Vektoren subkloniert und anschließend sequenziert werden, so wie es 30 z.B. bei Sanger et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 74:5463-5467, 1977) beschrieben ist.

Die erhaltenen DNA-Sequenzen können dann mit bekannten 35 Algorithmen bzw. Sequenzanalyse-Programmen wie z.B. dem von Staden (Nucleic Acids Research 14, 217-232(1986)), dem von

Marck (Nucleic Acids Research 16, 1829-1836 (1988)) oder dem GCG-Programm von Butler (Methods of Biochemical Analysis 39, 74-97 (1998)) untersucht werden.

Die neue für das Gen *rodA* kodierende DNA-Sequenz von C. glutamicum wurde gefunden, die als SEQ ID No. 1 Bestandteil der vorliegenden Erfindung ist. Weiterhin wurde aus der vorliegenden DNA-Sequenz mit den oben beschriebenen Methoden die Aminosäuresequenz des entsprechenden Proteins abgeleitet. In SEQ ID No. 2 ist die sich ergebende Aminosäuresequenz des *rodA*-Genproduktes dargestellt.

Kodierende DNA-Sequenzen, die sich aus SEQ ID No. 1 durch die Degeneriertheit des genetischen Kodes ergeben, sind ebenfalls Bestandteil der Erfindung. In gleicher Weise sind DNA-Sequenzen, die mit SEQ ID No. 1 oder Teilen von SEQ ID No. 1 hybridisieren, Bestandteil der Erfindung. In der Fachwelt sind weiterhin konservative Aminosäureaustausche wie z.B. Austausch von Glycin gegen Alanin oder von Asparaginsäure gegen Glutaminsäure in Proteinen als „Sinnmutationen“ („sense mutations“) bekannt, die zu keiner grundsätzlichen Veränderung der Aktivität des Proteins führen, d.h. funktionsneutral sind. Weiterhin ist bekannt, daß Änderungen am N- und/oder C-Terminus eines Proteins dessen Funktion nicht wesentlich beeinträchtigen oder sogar stabilisieren können. Angaben hierzu findet der Fachmann unter anderem bei Ben-Bassat et al. (Journal of Bacteriology 169:751-757 (1987)), bei O'Regan et al. (Gene 77:237-251 (1989)), bei Sahin-Toth et al. (Protein Sciences 3:240-247 (1994)), bei Hochuli et al. (Bio/Technology 6:1321-1325 (1988)) und in bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie. Aminosäuresequenzen, die sich in entsprechender Weise aus SEQ ID No. 2 ergeben, sind ebenfalls Bestandteil der Erfindung.

In gleicher Weise sind DNA-Sequenzen, die mit SEQ ID No. 1 oder Teilen von SEQ ID No. 1 hybridisieren Bestandteil der Erfindung. Schließlich sind DNA-Sequenzen Bestandteil der

Erfindung, die durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) unter Verwendung von Primern hergestellt werden, die sich aus SEQ ID No. 1 ergeben. Derartige Oligonukleotide haben typischerweise eine Länge von mindestens 15 Nukleotiden.

- 5 Anleitungen zur Identifizierung von DNA-Sequenzen mittels Hybridisierung findet der Fachmann unter anderem im Handbuch "The DIG System Users Guide for Filter Hybridization" der Firma Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim, Deutschland, 1993) und bei Liebl et al.
- 10 (International Journal of Systematic Bacteriology (1991) 41: 255-260). Die Hybridisierung findet unter stringenten Bedingungen statt, das heisst, es werden nur Hybride gebildet, bei denen Sonde und Zielsequenz, d. h. die mit der Sonde behandelten Polynukleotide, mindestens 70%
- 15 identisch sind. Es ist bekannt, dass die Stringenz der Hybridisierung einschließlich der Waschschritte durch Variieren der Pufferzusammensetzung, der Temperatur und der Salzkonzentration beeinflußt bzw. bestimmt wird. Die Hybridisierungsreaktion wird vorzugsweise bei relativ
- 20 niedriger Stringenz im Vergleich zu den Waschschritten durchgeführt (Hybaid Hybridisation Guide, Hybaid Limited, Teddington, UK, 1996).

Für die Hybridisierungsreaktion kann beispielsweise ein 5x SSC-Puffer bei einer Temperatur von ca. 50°C - 68°C eingesetzt werden. Dabei können Sonden auch mit Polynukleotiden hybridisieren, die weniger als 70% Identität zur Sequenz der Sonde aufweisen. Solche Hybride sind weniger stabil und werden durch Waschen unter stringenten Bedingungen entfernt. Dies kann beispielsweise durch Senken der Salzkonzentration auf 2x SSC und gegebenenfalls nachfolgend 0,5x SSC (The DIG System User's Guide for Filter Hybridisation, Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland, 1995) erreicht werden, wobei eine Temperatur von ca. 50°C - 68°C eingestellt wird. Es ist gegebenenfalls möglich die Salzkonzentration bis auf 0,1x

SSC zu senken. Durch schrittweise Erhöhung der Hybridisierungstemperatur in Schritten von ca. 1 - 2°C von 50°C auf 68°C können Polynukleotidfragmente isoliert werden, die beispielsweise mindestens 70% oder mindestens 5 80% oder mindestens 90% bis 95% Identität zur Sequenz der eingesetzten Sonde besitzen. Weitere Anleitungen zur Hybridisierung sind in Form sogenannter Kits am Markt erhältlich (z.B. DIG Easy Hyb von der Firma Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland, Catalog No. 10 1603558).

Anleitungen zur Amplifikation von DNA-Sequenzen mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) findet der Fachmann unter anderem im Handbuch von Gait: Oligonukleotide synthesis: A Practical Approach (IRL Press, Oxford, UK, 15 1984) und bei Newton und Graham: PCR (Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Deutschland, 1994).

Es wurde gefunden, daß coryneforme Bakterien nach Überexpression des rodA-Gens in verbesserter Weise Aminosäuren produzieren.

20 Zur Erzielung einer Überexpression kann die Kopienzahl der entsprechenden Gene erhöht werden, oder es kann die Promotor- und Regulationsregion oder die Ribosomenbindungsstelle, die sich stromaufwärts des Strukturgens befindet, mutiert werden. In gleicher Weise 25 wirken Expressionskassetten, die stromaufwärts des Strukturgens eingebaut werden. Durch induzierbare Promotoren ist es zusätzlich möglich, die Expression im Verlaufe der fermentativen Aminosäure-Produktion zu steigern. Durch Maßnahmen zur Verlängerung der Lebensdauer 30 der m-RNA wird ebenfalls die Expression verbessert. Weiterhin wird durch Verhinderung des Abbaus des Enzymproteins ebenfalls die Enzymaktivität verstärkt. Die Gene oder Genkonstrukte können entweder in Plasmiden mit unterschiedlicher Kopienzahl vorliegen oder im Chromosom

integriert und amplifiziert sein. Alternativ kann weiterhin eine Überexpression der betreffenden Gene durch Veränderung der Medienzusammensetzung und Kulturführung erreicht werden.

- 5 Anleitungen hierzu findet der Fachmann unter anderem bei Martin et al. (Bio/Technology 5, 137-146 (1987)), bei Guerrero et al. (Gene 138, 35-41 (1994)), Tsuchiya und Morinaga (Bio/Technology 6, 428-430 (1988)), bei Eikmanns et al. (Gene 102, 93-98 (1991)), in der Europäischen
- 10 Patentschrift 0 472 869, im US Patent 4,601,893, bei Schwarzer und Pühler (Bio/Technology 9, 84-87 (1991)), bei Reinscheid et al. (Applied and Environmental Microbiology 60, 126-132 (1994)), bei LaBarre et al. (Journal of Bacteriology 175, 1001-1007 (1993)), in der Patentanmeldung
- 15 WO 96/15246, bei Malumbres et al. (Gene 134, 15 - 24 (1993)), in der japanischen Offenlegungsschrift JP-A-10-229891, bei Jensen und Hammer (Biotechnology and Bioengineering 58, 191-195 (1998)), bei Makrides (Microbiological Reviews 60:512-538 (1996)) und in
- 20 bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie.

Zur Verstärkung wurde das erfindungsgemäße rodA-Gen beispielhaft mit Hilfe von episomalen Plasmiden überexprimiert. Als Plasmide eignen sich solche, die in coryneformen Bakterien repliziert werden. Zahlreiche bekannte Plasmidvektoren wie z.B. pZ1 (Menkel et al., Applied and Environmental Microbiology (1989) 64: 549-554), pEKEx1 (Eikmanns et al., Gene 102:93-98 (1991)) oder pHs2-1 (Sonnen et al., Gene 107:69-74 (1991)) beruhen auf den kryptischen Plasmiden pHM1519, pBL1 oder pGA1. Andere Plasmidvektoren wie z.B. solche, die auf pCG4 (US-A 4,489,160), oder pNG2 (Serwold-Davis et al., FEMS Microbiology Letters 66, 119-124 (1990)), oder pAG1 (US-A 5,158,891) beruhen, können in gleicher Weise verwendet werden.

Weiterhin eignen sich auch solche Plasmidvektoren mit Hilfe  
derer man das Verfahren der Genamplifikation durch  
Integration in das Chromosom anwenden kann, so wie es  
beispielsweise von Reinscheid et al. (Applied and  
5 Environmental Microbiology 60, 126-132 (1994)) zur  
Duplikation bzw. Amplifikation des hom-thrB-Operons  
beschrieben wurde. Bei dieser Methode wird das vollständige  
Gen in einen Plasmidvektor kloniert, der in einem Wirt  
(typischerweise *E. coli*), nicht aber in *C. glutamicum*  
10 replizieren kann. Als Vektoren kommen beispielsweise  
pSUP301 (Simon et al., Bio/Technology 1, 784-791 (1983)),  
pK18mob oder pK19mob (Schäfer et al., Gene 145, 69-73  
(1994)), pGEM-T (Promega corporation, Madison, WI, USA),  
pCR2.1-TOPO (Shuman (1994). Journal of Biological Chemistry  
15 269:32678-84; US-A 5,487,993), pCR®Blunt (Firma  
- Invitrogen, Groningen, Niederlande; Bernard et al., Journal  
of Molecular Biology, 234: 534-541 (1993)), pEM1 (Schrumpf  
et al, 1991, Journal of Bacteriology 173:4510-4516) oder  
pBGS8 (Spratt et al., 1986, Gene 41: 337-342) in Frage. Der  
20 Plasmidvektor, der das zu amplifizierende Gen enthält, wird  
anschließend durch Konjugation oder Transformation in den  
gewünschten Stamm von *C. glutamicum* überführt. Die Methode  
der Konjugation ist beispielsweise bei Schäfer et al.  
(Applied and Environmental Microbiology 60, 756-759 (1994))  
25 beschrieben. Methoden zur Transformation sind  
beispielsweise bei Thierbach et al. (Applied Microbiology  
and Biotechnology 29, 356-362 (1988)), Dunican und Shivnan  
(Bio/Technology 7, 1067-1070 (1989)) und Tauch et al. (FEMS  
Microbiological Letters 123, 343-347 (1994)) beschrieben.  
30 Nach homologer Rekombination mittels eines "cross over"-  
Ereignisses enthält der resultierende Stamm mindestens zwei  
Kopien des betreffenden Gens.

Zusätzlich kann es für die Produktion von L-Aminosäuren  
vorteilhaft sein, neben dem rodA-Gen eines oder mehrere  
35 Enzyme des jeweiligen Biosyntheseweges, der Glykolyse, der  
Anaplerotik, des Zitronensäure-Zyklus, des Pentosephosphat-

Zyklus, des Aminosäure-Exports und gegebenenfalls regulatorische Proteine zu verstärken, insbesondere überzuexprimieren.

So kann für die Herstellung von L-Aminosäuren zusätzlich 5 zur Verstärkung des rodA-Gens eines oder mehrere Gene, ausgewählt aus der Gruppe

- das für die Dihydridipicolinat-Synthase kodierende Gen dapA (EP-B 0 197 335),
- das für die Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase 10 kodierende Gen gap (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174:6076-6086),
- das für die Triosephosphat-Isomerase kodierende Gen tpi (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174:6076-6086),
- das für die 3-Phosphoglycerat-Kinase kodierende Gen pgk 15 (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174:6076-6086),
- das für die Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase kodierende Gen zwf (JP-A-09224661),
- das für die Pyruvat-Carboxylase kodierende Gen pyc (DE-A- 198 31 609),
- das für die Malat-Chinon-Oxidoreduktase kodierende Gen mqo (Molenaar et al., European Journal of Biochemistry 254, 395-403 (1998)),
- das für eine feed-back resistente Aspartatkinase kodierende Gen lysC (Accession No.P26512),
- das für den Lysin-Export kodierende Gen lysE 25 (DE-A-195 48 222),
- das für die Homoserin-Dehydrogenase kodierende Gen hom (EP-A 0131171),

- das für die Threonin-Dehydratase kodierende Gen *ilvA* (Möckel et al., Journal of Bacteriology (1992) 8065-8072)) oder das für eine "feed back resistente" Threonin-Dehydratase kodierende Allel *ilvA(Fbr)* (Möckel et al., 1994) Molecular Microbiology 13: 833-842),
- das für die Acetohydroxysäure-Synthase kodierenden Gen *ilvBN* (EP-B 0356739),
- das für die Dihydroxysäuredehydratase kodierende Gen *ilvD* (Sahm und Eggeling (1999) Applied and Environmental Microbiology 65: 1973-1979),
- das für das *Zwal*-Protein kodierende Gen *zwal* (DE: 19959328.0, DSM 13115),

verstärkt, insbesondere überexprimiert werden.

Weiterhin kann es für die Produktion von L-Aminosäuren vorteilhaft sein, zusätzlich zur Verstärkung des *rodA*-Gens eines oder mehrere Gene, ausgewählt aus der Gruppe

- das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase kodierende Gen *pck* (DE 199 50 409.1; DSM 13047),
- das für die Glucose-6-Phosphat-Isomerase kodierende Gen *pgi* (US 09/396,478; DSM 12969),
- das für die Pyruvat-Oxidase kodierende Gen *poxB* (DE: 1995 1975.7; DSM 13114),
- das für das *Zwa2*-Protein kodierende Gen *zwa2* (DE: 19959327.2, DSM 13113)

abzuschwächen, insbesondere die Expression zu verringern.

Weiterhin kann es für die Produktion von Aminosäuren vorteilhaft sein, neben der Überexpression des *rodA*-Gens

unerwünschte Nebenreaktionen auszuschalten (Nakayama: "Breeding of Amino Acid Producing Micro-organisms", in: Overproduction of Microbial Products, Krumphanzl, Sikyta, Vanek (eds.), Academic Press, London, UK, 1982).

- 5 Die erfindungsgemäß hergestellten Mikroorganismen sind ebenfalls Gegenstand der Erfindung und können kontinuierlich oder diskontinuierlich im batch - Verfahren (Satzkultivierung) oder im fed batch (Zulaufverfahren) oder repeated fed batch Verfahren (repetitives Zulaufverfahren)
- 10 zum Zwecke der Produktion von Aminosäuren kultiviert werden. Eine Zusammenfassung über bekannte Kultivierungsmethoden ist im Lehrbuch von Chmiel (Bioprozeßtechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991)) oder im Lehrbuch
- 15 von Storhas (Bioreaktoren und periphere Einrichtungen (Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden, 1994)) beschrieben.

Das zu verwendende Kulturmedium muß in geeigneter Weise den Ansprüchen der jeweiligen Stämme genügen. Beschreibungen von Kulturmedien verschiedener Mikroorganismen sind im Handbuch "Manual of Methods for General Bacteriology" der American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA, 1981) enthalten.

Als Kohlenstoffquelle können Zucker und Kohlehydrate wie z.B. Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke und Cellulose, Öle und Fette wie z.B. Sojaöl, Sonnenblumenöl, Erdnußöl und Kokosfett, Fettsäuren wie z.B. Palmitinsäure, Stearinsäure und Linolsäure, Alkohole wie z.B. Glycerin und Ethanol und organische Säuren wie z.B. Essigsäure verwendet werden. Diese Stoffe können einzeln oder als Mischung verwendet werden.

Als Stickstoffquelle können organische Stickstoff-haltige Verbindungen wie Peptone, Hefeextrakt, Fleischextrakt, Malzextrakt, Maisquellwasser, Sojabohnenmehl und Harnstoff oder anorganische Verbindungen wie Ammoniumsulfat,

Ammoniumchlorid, Ammoniumphosphat, Ammoniumcarbonat und Ammoniumnitrat verwendet werden. Die Stickstoffquellen können einzeln oder als Mischung verwendet werden.

Als Phosphorquelle können Phosphorsäure, Kaliumdihydrogenphosphat oder Dikaliumhydrogenphosphat oder die entsprechenden Natrium haltigen Salze verwendet werden. Das Kulturmedium muß weiterhin Salze von Metallen enthalten wie z.B. Magnesiumsulfat oder Eisensulfat, die für das Wachstum notwendig sind. Schließlich können essentielle Wuchsstoffe wie Aminosäuren und Vitamine zusätzlich zu den oben genannten Stoffen eingesetzt werden. Dem Kulturmedium können überdies geeignete Vorstufen zugesetzt werden. Die genannten Einsatzstoffe können zur Kultur in Form eines einmaligen Ansatzes hinzugegeben oder in geeigneter Weise während der Kultivierung zugefüttert werden.

Zur pH-Kontrolle der Kultur werden basische Verbindungen wie Natriumhydroxid, Kaliumhydroxid, Ammoniak bzw. Ammoniakwasser oder saure Verbindungen wie Phosphorsäure oder Schwefelsäure in geeigneter Weise eingesetzt. Zur Kontrolle der Schaumentwicklung können Antischaummittel wie z.B. Fettsäurepolyglykolester eingesetzt werden. Zur Aufrechterhaltung der Stabilität von Plasmiden können dem Medium geeignete selektiv wirkende Stoffe wie z.B. Antibiotika hinzugefügt werden. Um aerobe Bedingungen aufrechtzuerhalten, werden Sauerstoff oder Sauerstoff haltige Gasmischungen wie z.B. Luft in die Kultur eingetragen. Die Temperatur der Kultur liegt normalerweise bei 20°C bis 45°C und vorzugsweise bei 25°C bis 40°C. Die Kultur wird solange fortgesetzt, bis sich ein Maximum des gewünschten Produktes gebildet hat. Dieses Ziel wird normalerweise innerhalb von 10 Stunden bis 160 Stunden erreicht.

Methoden zur Bestimmung von L-Aminosäuren sind aus dem Stand der Technik bekannt. Die Analyse kann zum Beispiel so wie bei Spackman et al. (Analytical Chemistry, 30, (1958),

1190) beschrieben durch Ionenaustausch-Chromatographie mit anschließender Ninhydrin-Derivatisierung erfolgen, oder sie kann durch reversed phase HPLC erfolgen, so wie bei Lindroth et al. (Analytical Chemistry (1979) 51: 1167-1174) 5 beschrieben.

Das erfindungsgemäße Verfahren dient zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren.

Die vorliegende Erfindung wird im folgenden anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert.

10 Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli* sowie alle Techniken zur Restriktion, Klenow- und alkalische Phosphatasebehandlung wurden nach Sambrook et al. (Molecular Cloning. A Laboratory Manual (1989) Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA)

15 durchgeführt. Methoden zur Transformation von *Escherichia coli* sind ebenfalls in diesem Handbuch beschrieben.

Die Zusammensetzung gängiger Nährmedien wie LB- oder TY-Medium kann ebenfalls dem Handbuch von Sambrook et al. entnommen werden.

#### 20 Beispiel 1

Herstellung einer genomischen Cosmid-Genbank aus *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032

Chromosomale DNA aus *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 wurde wie bei Tauch et al. (1995, Plasmid 33:168-179)

25 beschrieben isoliert und mit dem Restriktionsenzym Sau3AI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung Sau3AI, Code no. 27-0913-02) partiell gespalten. Die DNA-Fragmente wurden mit shrimp alkalischer Phosphatase (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland,

30 Produktbeschreibung SAP, Code no. 1758250) dephosphoryliert. Die DNA des Cosmid-Vektors SuperCos1 (Wahl et al. (1987) Proceedings of the National Academy of

Sciences USA 84:2160-2164), bezogen von der Firma Stratagene (La Jolla, USA, Produktbeschreibung SuperCos1 Cosmid Vektor Kit, Code no. 251301) wurde mit dem Restriktionsenzym XbaI (Amersham Pharmacia, Freiburg, 5 Deutschland, Produktbeschreibung XbaI, Code no. 27-0948-02) gespalten und ebenfalls mit shrimp alkalischer Phosphatase dephosphoryliert.

Anschließend wurde die Cosmid-DNA mit dem Restriktionsenzym BamHI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, 10 Deutschland, Produktbeschreibung BamHI, Code no. 27-0868-04) gespalten. Die auf diese Weise behandelte Cosmid-DNA wurde mit der behandelten ATCC13032-DNA gemischt und der Ansatz mit T4-DNA-Ligase (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung T4-DNA-Ligase, Code no. 27-0870-04) 15 behandelt. Das Ligationsgemisch wurde anschließend mit Hilfe des Gigapack II XL Packing Extracts (Stratagene, La Jolla, USA, Produktbeschreibung Gigapack II XL Packing Extract, Code no. 200217) in Phagen verpackt.

Zur Infektion des E. coli Stammes NM554 (Raleigh et al. 20 1988, Nucleic Acid Research 16:1563-1575) wurden die Zellen in 10 mM MgSO<sub>4</sub> aufgenommen und mit einem Aliquot der Phagensuspension vermischt. Infektion und Titerung der Cosmidbank wurden wie bei Sambrook et al. (1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor) 25 beschrieben durchgeführt, wobei die Zellen auf LB-Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) mit 100 mg/l Ampicillin ausplattiert wurden. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C wurden rekombinante Einzelklone selektiert.

#### Beispiel 2

30 Isolierung und Sequenzierung des rodA-Gens

Die Cosmid-DNA einer Einzelkolonie wurde mit dem Qiaprep Spin Miniprep Kit (Product No. 27106, Qiagen, Hilden, Germany) nach Herstellerangaben isoliert und mit dem

Restriktionsenzym Sau3AI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung Sau3AI, Product No. 27-0913-02) partiell gespalten. Die DNA-Fragmente wurden mit shrimp alkalischer Phosphatase (Roche Diagnostics GmbH, 5 Mannheim, Deutschland, Produktbeschreibung SAP, Product No. 1758250) dephosphoryliert. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung erfolgte die Isolierung der Cosmidfragmente im Größenbereich von 1500 bis 2000 bp mit dem QiaExII Gel Extraction Kit (Product No. 20021, Qiagen, Hilden, 10 Germany).

Die DNA des Sequenzervektors pZero-1, bezogen von der Firma Invitrogen (Groningen, Niederlande, Produktbeschreibung Zero Background Cloning Kit, Product No. K2500-01), wurde mit dem Restriktionsenzym BamHI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, 15 Produktbeschreibung BamHI, Product No. 27-0868-04) gespalten. Die Ligation der Cosmidfragmente in den Sequenzervektor pZero-1 wurde wie von Sambrook et al. (1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor) beschrieben durchgeführt, wobei das DNA-Gemisch mit T4-Ligase (Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) über Nacht inkubiert wurde. Dieses Ligationsgemisch wurde anschließend in den *E. coli* Stamm DH5 $\alpha$ MCR (Grant, 1990, Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A., 20 87:4645-4649) elektroporiert (Tauch et al. 1994, FEMS Microbiol Letters, 123:343-7) und auf LB-Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) mit 50 mg/l Zeocin ausplattiert.

Die Plasmidpräparation der rekombinanten Klone erfolgte mit dem Biorobot 9600 (Product No. 900200, Qiagen, Hilden, 30 Deutschland). Die Sequenzierung erfolgte nach der Dideoxy-Kettenabbruch-Methode von Sanger et al. (1977, Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A., 74:5463-5467) mit Modifikationen nach Zimmermann et al. (1990, Nucleic Acids Research, 18:1067). Es wurde der "RR dRhodamin 35 Terminator Cycle Sequencing Kit" von PE Applied Biosystems

(Product No. 403044, Weiterstadt, Deutschland) verwendet.  
Die gelelektrophoretische Auftrennung und Analyse der  
Sequenzierreaktion erfolgte in einem "Rotiphorese NF  
Acrylamid/Bisacrylamid" Gel (29:1) (Product No. A124.1,  
5 Roth, Karlsruhe, Germany) mit dem "ABI Prism 377"  
Sequenziergerät von PE Applied Biosystems (Weiterstadt,  
Deutschland).

Die erhaltenen Roh-Sequenzdaten wurden anschließend unter  
Anwendung des Staden-Programmpakets (1986, Nucleic Acids  
10 Research, 14:217-231) Version 97-0 prozessiert. Die  
Einzelsequenzen der pZerol-Derivate wurden zu einem  
zusammenhängenden Contig assembliert. Die computergestützte  
Kodierbereichsanalyse wurde mit dem Programm XNIP (Staden,  
1986, Nucleic Acids Research, 14:217-231) angefertigt.  
15 Die erhaltene Nukleotidsequenz ist in SEQ ID No. 1  
dargestellt. Die Analyse der Nukleotidsequenz ergab ein  
offenes Leseraster von 1326 Basenpaaren, welches als rodA-  
Gen bezeichnet wurde. Das rodA-Gen kodiert für ein Protein  
von 441 Aminosäuren.

## SEQUENZPROTOKOLL

&lt;110&gt; Degussa-Hüls AG

5 &lt;120&gt; Neue für das rodA-Gen kodierende Nukleotidsequenzen

&lt;130&gt; 000515 BT

&lt;140&gt;

10 &lt;141&gt;

&lt;160&gt; 2

15 &lt;170&gt; PatentIn Ver. 2.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 1761

&lt;212&gt; DNA

20 &lt;213&gt; Corynebacterium glutamicum

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (238)..(1560)

&lt;223&gt; rodA-Gen

25

&lt;400&gt; 1

gaatgaagct ggcaccttgt cactcaagga atcctgtgaa aacggtacgt ctttcaaatt 60

30 ggtatgattta cccgcacatctg ttccgcggtag tgtcgcagga ttaccgtctg ggtcgtatga 120

cgaggtccag gcgcaaatgc aacggctggc tgctcaagct ttgccagtg gcgtgaacctt 180

agaagtaaca accgggtggcg atagaaacga acccggagtc aattgttaggg aggtctc 237

35

atg aac acg ctt gaa cga tta aag ctt cgt cgc acg gaa atg tgg ctg 285

Met Asn Thr Leu Glu Arg Leu Lys Leu Arg Arg Thr Glu Met Trp Leu  
1 5 10 15

40

ctg ata ctt gcc aca ctc gtt gtg tcg atc atg ttc atc agc ctc gag 333

Leu Ile Leu Ala Thr Leu Val Val Ser Ile Met Phe Ile Ser Leu Glu  
20 25 30

45

ctg gcc atg ggc aat gag ttg ggt acc cat att ttg atg ctg atg ggc 381

Leu Ala Met Gly Asn Glu Leu Gly Thr His Ile Leu Met Leu Met Gly  
35 40 45

50

gga tat atc ggt atc ttc atc gtc gcg cac cta gcc atg gca tgg gtg 429

Gly Tyr Ile Gly Ile Phe Ile Val Ala His Leu Ala Met Ala Trp Val  
50 55 60

gcg ccg ttt gct gat caa atc atg ctg cct gtg gtg gcg gtg ctc aat 477

Ala Pro Phe Ala Asp Gln Ile Met Leu Pro Val Val Ala Val Leu Asn  
65 70 75 80

55

ggc att ggt ttg gtg atg att tat cgc ctt gat gag gcc acg ggc tac 525

Gly Ile Gly Leu Val Met Ile Tyr Arg Leu Asp Glu Ala Thr Gly Tyr  
85 90 95

agc acg gtc aat agc caa ttg atg tgg acg gtt ggc gtc acg ctg	573
Ser Thr Val Asn Ser Gln Leu Met Trp Thr Val Val Gly Val Thr Leu	
100 105 110	
5 atg gtg gct gtg ttg ctg ttg cgt gat tac aag tcg ctt tcg cgt	621
Met Val Ala Val Leu Leu Leu Arg Asp Tyr Lys Ser Leu Ser Arg	
115 120 125	
10 tat tcc tac ctc ctc ggt gtg gtg ggc atc gtg ctg ctg gcg ctg cct	669
Tyr Ser Tyr Leu Leu Gly Val Val Gly Ile Val Leu Leu Ala Leu Pro	
130 135 140	
15 ctc gtg tgg ccg cag cca ggc ggc gtg gaa gcc cgc atc tgg att tgg	717
Leu Val Trp Pro Gln Pro Gly Gly Val Glu Ala Arg Ile Trp Ile Trp	
145 150 155 160	
ctt gga cct ttc tcc atc cag cca ggt gag ttc tcc aag att ttg ctg	765
Leu Gly Pro Phe Ser Ile Gln Pro Gly Glu Phe Ser Lys Ile Leu Leu	
165 170 175	
20 ctg ctg ttc ttt gct cag ctg cta gcc acc aag cgt gct ttg ttt act	813
Leu Leu Phe Phe Ala Gln Leu Leu Ala Thr Lys Arg Ala Leu Phe Thr	
180 185 190	
25 gtt gcg ggc tac cgt ttc ctc ggc atg gat ttc cct cgt ttg cgt gac	861
Val Ala Gly Tyr Arg Phe Leu Gly Met Asp Phe Pro Arg Leu Arg Asp	
195 200 205	
30 ctc gcg ccg att ctt gtg gtg tgg gcg ttg gct att ttg atc atg gct	909
Leu Ala Pro Ile Leu Val Val Trp Ala Leu Ala Ile Leu Ile Met Ala	
210 215 220	
35 ggc gcc aac gac ttc ggt cct gca ctg ctg ctt ttc act acc gtt ttg	957
Gly Ala Asn Asp Phe Gly Pro Ala Leu Leu Leu Phe Thr Thr Val Leu	
225 230 235 240	
40 gcc atg gtg tac ctg gct acc ggc cgt ggt tcc tgg ctg ttg att ggt	1005
Ala Met Val Tyr Leu Ala Thr Gly Arg Gly Ser Trp Leu Leu Ile Gly	
245 250 255	
45 gct gtg ttg gtg gct gtc ggc gcg ttc gcg gtg tac caa gtt tca agc	1053
Ala Val Leu Val Ala Val Gly Ala Phe Ala Val Tyr Gln Val Ser Ser	
260 265 270	
50 aag att cag gaa cgc gtg caa aac ttc gtg gat cct gtg gcc cac tat	1101
Lys Ile Gln Glu Arg Val Gln Asn Phe Val Asp Pro Val Ala His Tyr	
275 280 285	
55 gac acc acc ggt tac cag ctg tcc cag tcc ttg ttt ggc atg agt tgg	1149
Asp Thr Thr Gly Tyr Gln Leu Ser Gln Ser Leu Phe Gly Met Ser Trp	
290 295 300	
ggc gga atc acc ggc acc ggc att ggt cag ggt tac ccc aac atg atc	1197
Gly Gly Ile Thr Gly Thr Gly Ile Gly Gln Gly Tyr Pro Asn Met Ile	
305 310 315 320	
cct gtc gtg cac tcg gac ttc att ctc gca gcc att ggt gag gag ctt	1245
Pro Val Val His Ser Asp Phe Ile Leu Ala Ala Ile Gly Glu Glu Leu	
325 330 335	

ggt ctg att ggc ctg gcg gcc atc atc gtg ctg ttt ggt gtg ttt gtc 1293  
 Gly Leu Ile Gly Leu Ala Ala Ile Ile Val Leu Phe Gly Val Phe Val  
 340 345 350

5 acc cgc ggt atg cgc acc gct acc ctg gct cgt gac agc tac gga aag 1341  
 Thr Arg Gly Met Arg Thr Ala Thr Leu Ala Arg Asp Ser Tyr Gly Lys  
 355 360 365

10 ctc gtg gca tct ggt ctg tcg atg acc atc atg atc cag att ttc gtc 1389  
 Leu Val Ala Ser Gly Leu Ser Met Thr Ile Met Ile Gln Ile Phe Val  
 370 375 380

15 gtc gtg gca ggt att tct tca ctg atg ccc atg aca ggt ttg acc act 1437  
 Val Val Ala Gly Ile Ser Ser Leu Met Pro Met Thr Gly Leu Thr Thr  
 385 390 395 400

20 ccg ttt atg tcc cag ggt ggt tca tcc ctg atg gct aac tac att ctg 1485  
 Pro Phe Met Ser Gln Gly Ser Ser Leu Met Ala Asn Tyr Ile Leu  
 405 410 415

atg gcc atc atc ttg cgt att tct gac agt gcc cgc cga cct gtc atg 1533  
 Met Ala Ile Ile Leu Arg Ile Ser Asp Ser Ala Arg Arg Pro Val Met  
 420 425 430

25 tcc aag caa gca tcg gag gtg gct gcg tgaaccgctc gattcgaatc 1580  
 Ser Lys Gln Ala Ser Glu Val Ala Ala  
 435 440

30 acatccctct tctctttgct cctgatcttgc tgctcgtag caaacctcac ctggattcag 1640  
 gcttttaggg acgatgatct tgctcagaac ccactgaacg cacgtggttt cctggaggcg 1700  
 aagtccactc cgcgtggaca gattcaact ggtggccaag tactcgcaga gtcctccag 1760  
 35 g 1761

40 <210> 2  
 <211> 441  
 <212> PRT  
 <213> *Corynebacterium glutamicum*

45 <400> 2  
 Met Asn Thr Leu Glu Arg Leu Lys Leu Arg Arg Thr Glu Met Trp Leu  
 1 5 10 15  
 Leu Ile Leu Ala Thr Leu Val Val Ser Ile Met Phe Ile Ser Leu Glu  
 20 25 30

50 Leu Ala Met Gly Asn Glu Leu Gly Thr His Ile Leu Met Leu Met Gly  
 35 40 45

55 Gly Tyr Ile Gly Ile Phe Ile Val Ala His Leu Ala Met Ala Trp Val  
 50 55 60

Ala Pro Phe Ala Asp Gln Ile Met Leu Pro Val Val Ala Val Leu Asn  
 65 70 75 80

Gly Ile Gly Leu Val Met Ile Tyr Arg Leu Asp Glu Ala Thr Gly Tyr  
 85 90 95

5 Ser Thr Val Asn Ser Gln Leu Met Trp Thr Val Val Gly Val Thr Leu  
 100 105 110

Met Val Ala Val Leu Leu Leu Arg Asp Tyr Lys Ser Leu Ser Arg  
 115 120 125

10 Tyr Ser Tyr Leu Leu Gly Val Val Gly Ile Val Leu Leu Ala Leu Pro  
 130 135 140

Leu Val Trp Pro Gln Pro Gly Gly Val Glu Ala Arg Ile Trp Ile Trp  
 145 150 155 160

15 Leu Gly Pro Phe Ser Ile Gln Pro Gly Glu Phe Ser Lys Ile Leu Leu  
 165 170 175

20 Leu Leu Phe Phe Ala Gln Leu Leu Ala Thr Lys Arg Ala Leu Phe Thr  
 180 185 190

Val Ala Gly Tyr Arg Phe Leu Gly Met Asp Phe Pro Arg Leu Arg Asp  
 195 200 205

25 Leu Ala Pro Ile Leu Val Val Trp Ala Leu Ala Ile Leu Ile Met Ala  
 210 215 220

Gly Ala Asn Asp Phe Gly Pro Ala Leu Leu Leu Phe Thr Thr Val Leu  
 225 230 235 240

30 Ala Met Val Tyr Leu Ala Thr Gly Arg Gly Ser Trp Leu Leu Ile Gly  
 245 250 255

35 Ala Val Leu Val Ala Val Gly Ala Phe Ala Val Tyr Gln Val Ser Ser  
 260 265 270

Lys Ile Gln Glu Arg Val Gln Asn Phe Val Asp Pro Val Ala His Tyr  
 275 280 285

40 Asp Thr Thr Gly Tyr Gln Leu Ser Gln Ser Leu Phe Gly Met Ser Trp  
 290 295 300

Gly Gly Ile Thr Gly Thr Gly Ile Gly Gln Gly Tyr Pro Asn Met Ile  
 305 310 315 320

45 Pro Val Val His Ser Asp Phe Ile Leu Ala Ala Ile Gly Glu Glu Leu  
 325 330 335

50 Gly Leu Ile Gly Leu Ala Ala Ile Ile Val Leu Phe Gly Val Phe Val  
 340 345 350

Thr Arg Gly Met Arg Thr Ala Thr Leu Ala Arg Asp Ser Tyr Gly Lys  
 355 360 365

55 Leu Val Ala Ser Gly Leu Ser Met Thr Ile Met Ile Gln Ile Phe Val  
 370 375 380

Val Val Ala Gly Ile Ser Ser Leu Met Pro Met Thr Gly Leu Thr Thr  
 385 390 395 400

Pro Phe Met Ser Gln Gly Gly Ser Ser Leu Met Ala Asn Tyr Ile Leu  
405 410 415

5 Met Ala Ile Ile Leu Arg Ile Ser Asp Ser Ala Arg Arg Pro Val Met  
420 425 430

Ser Lys Gln Ala Ser Glu Val Ala Ala  
435 440

## Patentansprüche

1. Isoliertes Polynukleotid aus coryneformen Bakterien, enthaltend eine für das rodA-Gen kodierende Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe 5
  - a) Polynukleotid, das mindestens zu 70% identisch ist mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2 enthält,
  - 10 b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70% identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2,
  - 15 c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den Polynukleotiden von a) oder b), und
  - d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15 aufeinanderfolgende Nukleotide der Polynukleotidsequenz von a), b) oder c), wobei das Polypeptid bevorzugt die Aktivität des 20 Zellteilungsproteins RodA aufweist.
2. Polynukleotid gemäß Anspruch 1, wobei das Polynukleotid eine in coryneformen Bakterien replizierbare, bevorzugt rekombinante DNA ist.
3. Polynukleotid gemäß Anspruch 1, wobei das Polynukleotid 25 eine RNA ist.
4. Polynukleotid gemäß Anspruch 2, enthaltend die Nukleinsäuresequenz wie in SEQ ID No. 1 dargestellt.
5. Replizierbare DNA gemäß Anspruch 2, enthaltend (i) die Nukleotidsequenz, gezeigt in SEQ ID No. 1, oder

- (ii) mindestens eine Sequenz, die der Sequenz
  - (i) innerhalb des Bereichs der Degeneration des genetischen Kodes entspricht, oder
- 5 (iii) mindestens eine Sequenz, die mit der zur Sequenz
  - (i) oder (ii) komplementären Sequenz hybridisiert, und gegebenenfalls
- (iv) funktionsneutrale Sinnmutationen in (i).

6. Replizierbare DNA gemäß Anspruch 5, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, daß die Hybridisierung unter einer Stringenz entsprechend höchstens 2x SSC durchgeführt wird.

7. Polynukleotidsequenz gemäß Anspruch 1, die für ein Polypeptid kodiert, das die in SEQ ID No. 2 dargestellte Aminosäuresequenz enthält.

15 8. Coryneform Bakterien, in denen das rodA-Gen verstärkt, insbesondere überexprimiert wird.

9. Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, daß man folgende Schritte 20 durchführt:

- a) Fermentation der die gewünschte L-Aminosäure produzierenden coryneformen Bakterien, in denen man zumindest das rodA-Gen oder dafür kodierende Nukleotidsequenzen verstärkt, insbesondere überexprimiert;
- b) Anreicherung der L-Aminosäure im Medium oder in den Zellen der Bakterien, und
- c) Isolieren der L-Aminosäure.

10. Verfahren gemäß Anspruch 9, d a d u r c h 30 g e k e n n z e i c h n e t, daß man Bakterien

einsetzt, in denen man zusätzlich weitere Gene des Biosyntheseweges der gewünschten L-Aminosäure verstärkt.

11. Verfahren gemäß Anspruch 9, dadurch

5 gekennzeichnet, daß man Bakterien einsetzt, in denen die Stoffwechselwege zumindest teilweise ausgeschaltet sind, die die Bildung der gewünschten L-Aminosäure verringern.

12. Verfahren gemäß Anspruch 9, dadurch

10 gekennzeichnet, daß man einen mit einem Plasmidvektor transformierten Stamm einsetzt, und der Plasmidvektor die für das rodA-Gen kodierende Nukleotidsequenz trägt.

13. Verfahren gemäß Anspruch 9, dadurch

15 gekennzeichnet, daß man die Expression des (der) Polynukleotides (e), das (die) für das rodA-Gen kodiert (kodieren) verstärkt, insbesondere überexprimiert.

14. Verfahren gemäß Anspruch 9, dadurch

20 gekennzeichnet, daß man die katalytischen Eigenschaften des Polypeptids (Enzymprotein) erhöht, für das das Polynukleotid rodA kodiert.

15. Verfahren gemäß Anspruch 9, dadurch

25 gekennzeichnet, daß man zur Herstellung von L-Aminosäuren coryneforme Mikroorganismen fermentiert, in denen man gleichzeitig eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe

15.1 das für die Dihydrodipicolinat-Synthase kodierende Gen dapA,

30 15.2 das für die Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase kodierende Gen gap,

15.3 das für die Triosephosphat-Isomerase kodierende Gen *tpi*,

15.4 das für die 3-Phosphoglycerat-Kinase kodierende Gen *pgk*,

5 15.5 das für die Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase kodierende Gen *zwf*,

15.6 das für die Pyruvat-Carboxylase kodierende Gen *pyc*,

10 15.7 das für die Malat-Chinon-Oxidoreduktase kodierende Gen *mqa*,

15.8 das für eine feed-back resistente Aspartatkinase kodierende Gen *lysC*,

15.9 das für den Lysin-Export kodierende Gen *lysE*,

15.10 das für die Homoserin-Dehydrogenase kodierende Gen *hom*,

15.11 das für die Threonin-Dehydratase kodierende Gen *ilvA* oder das für eine feed back resistente Threonin-Dehydratase kodierende Allel *ilvA(Fbr)*,

20 15.12 das für die Acetohydroxysäure-Synthase kodierende Gen *ilvBN*,

15.13 das für die Dihydroxysäuredehydratase kodierende Gen *ilvD*,

15.14 das für das *Zwal*-Protein kodierende Gen *zwal* verstärkt bzw. überexprimiert.

25

16. Verfahren gemäß Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß man zur Herstellung von L-Aminosäuren coryneforme Mikroorganismen

fermentiert, in denen man gleichzeitig eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe

- 16.1 das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase kodierende Gen *pck*,
- 5 16.2 das für die Glucose-6-Phosphat-Isomerase kodierende Gen *pgi*,
- 16.3 das für die Pyruvat-Oxidase kodierende Gen *poxB*
- 16.4 das für das Zwa2-Protein kodierende Gen *zwa2* abschwächt.

10 17. Coryneforme Bakterien, die einen Vektor enthalten, der ein Polynukleotid gemäß Anspruch 1 trägt.

18. Verfahren gemäß einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß man Mikroorganismen der Art *Corynebacterium glutamicum* einsetzt.

15 19. Verfahren zum Auffinden von RNA, cDNA und DNA, um Nukleinsäuren, beziehungsweise Polynukleotide oder Gene zu isolieren, die für das Zellteilungsprotein RodA kodieren oder eine hohe Ähnlichkeit mit der Sequenz des rodA-Gens aufweisen, dadurch gekennzeichnet, daß man das Polynukleotid, enthaltend die Polynukleotidsequenzen gemäß den Ansprüchen 1, 2, 3 oder 4, als Hybridisierungssonden einsetzt.

20

**Zusammenfassung**

Die Erfindung betrifft ein isoliertes Polynukleotid, enthaltend eine Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe

- 5    a) Polynukleotid, das mindestens zu 70% identisch ist mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2 enthält,
- b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70% identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2,
- c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den Polynukleotiden von a) oder b), und
- d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15 aufeinanderfolgende Nukleotide der Polynukleotidsequenz von a), b) oder c),

15    und ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren unter Verwendung von coryneformen Bakterien, in denen zumindest das rodA-Gen verstärkt vorliegt, und die 20 Verwendung von Polynukleotiden, die die erfindungsgemäßen Sequenzen enthalten, als Hybridisierungssonden.